

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044422**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.25

(21) Номер заявки
202390485

(22) Дата подачи заявки
2023.02.10

(51) Int. Cl. **C07K 1/16** (2023.01)
C07K 1/34 (2023.01)
B01D 11/04 (2023.01)
C07K 1/02 (2023.01)
C07K 14/475 (2023.01)

(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ ИФР-1

(43) **2023.08.23**

(96) **2023000023 (RU) 2023.02.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДУХОВЛИНОВ ИЛЬЯ
ВЛАДИМИРОВИЧ; АЛЕКСЕЕВ
АЛЕКСЕЙ ВИКТОРОВИЧ (RU)**

(72) Изобретатель:
**Духовлинов Илья Владимирович,
Алексеев Алексей Викторович,
Чирак Евгений Леонидович, Чирак
Елизавета Романовна, Рябченкова
Анастасия Андреевна, Копать
Владимир Владиславович, Карасёв
Евгений Сергеевич, Саенко Анна
Игоревна, Парфенова Юлия
Геннадьевна (RU)**

(74) Представитель:
Харин А.В. (RU)

(56) **WO-A1-9632407
US-B1-7071313**

FORBES B. et al. An insulin-like growth factor-binding protein purified from medium conditioned by a human lung fibroblast cell line (He[39]L) has a novel N-terminal sequence. *Journal of Endocrinology*, 1990, 126(3), p. 497-506, реферат

MILLER James A. et al. Oxidative refolding of insulin-like growth factor 1 yields two products of similar thermodynamic stability: a bifurcating protein-folding pathway. *Biochemistry*, 1993, 32(19), p. 5203-5213, реферат, страницы 5205-5207

MATTHIESEN Finn et al. Stabilization of recombinantly expressed proteins. *Annals New York Academy of Sciences*, 1996, 782(1), p. 413-421

(57) Изобретение относится к способу очистки белка ИФР-1, включающему: а) денатурацию белка с помощью солубилизирующего буфера, содержащего 7-8 М мочевины и 2-10 мМ дитиотреитола, с рН не менее 12,5; б) фолдинг белка; с) хроматографическую очистку; d) смену буферного раствора; причем стадия фолдинга (b) включает: b1) смешивание полученной на стадии (a) смеси с фолдирующим буфером в соотношении 1:2-1:3 об.:об., причем фолдирующий буфер содержит воду, стабилизатор, представляющий собой сахар или полиол, и пропанол; и с окислительно-восстановительным компонентом, представляющим собой цистеин и цистамин, который содержится в указанном фолдирующем буфере или добавляется отдельно; и инкубирование полученной смеси в течение не менее 5 суток; b2) разведение полученной на стадии (b1) смеси ацетатным буфером в соотношении 1:3-1:3,5 об.:об. таким образом, чтобы рН составлял 5,4-5,7; b3) добавление перекиси водорода к полученной на стадии (b2) смеси в концентрации 0,03-1,96 ммоль/л, инкубирование в течение не менее 30 мин; b4) центрифугирование полученной смеси и фильтрацию супернатанта, который затем направляют на стадию (c); а также к способу получения ИФР-1, включающему указанный выше способ очистки. Предложенным способом обеспечивается, в частности, больший выход продукта и больший выход правильно уложенных, т. е. активных, форм ИФР-1.

B1**044422****044422****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к производству белка ИФР-1 для нужд фармацевтической и ветеринарной промышленности и других сфер, где требуется высококачественный чистый белок ИФР-1. В частности, раскрывается способ очистки белка ИФР-1 и препарат белка, получаемый этим способом.

Сведения о предшествующем уровне техники

ИФР-1 (инсулиноподобный фактор роста 1, соматомедин С, IGF1, insulin-like growth factor 1) является гормоном из семейства инсулиноподобных факторов роста, по структуре и функциям похожий на инсулин. Он участвует в эндокринной, аутокринной и паракринной регуляции процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма, прежде всего костной и мышечной тканей, а также имеет различные иные функции. Белок применяется в качестве маркера, позволяющего диагностировать нарушения роста у детей и акромегалию и контролировать заместительное лечение гормоном роста. Кроме этого, ИФР-1 применяется в качестве лекарственного средства для длительной терапии при нарушении роста у детей и подростков (Increlex, Ipsen Biopharmaceuticals, Inc), а также показана возможность его применения в качестве нейропротективного средства при инсульте (RU2711111, WO 93/08828) и для лечения сложных для ведения ран (Garoufalia Z, et al. Insulin-like growth factor-1 and wound healing, a potential answer to non-healing wounds: A systematic review of the literature and future perspectives. Biomed Rep. 2021 Aug; 15(2):66).

Препараты ИФР-1 применяются спортсменами для набора мышечной массы и увеличения силовых показателей и используют в ветеринарии, например для повышения привеса крупного и мелкого рогатого скота, свиней. ИФР-1 включают в состав космецевтических средств, предназначенных для борьбы с признаками старения кожи (DermaHeal Cosmeceutical Mask Pack, YBK Investment, Inc.).

В современной индустрии имеется все возрастающая потребность в получении белка ИФР-1 в больших количествах при приемлемом качестве.

В промышленности ИФР-1 получают методами биотехнологии с помощью различных экспрессионных систем и с использованием рекомбинантных нуклеиновокислотных молекул. Как правило, используют бактерии, например *Escherichia coli*, и дрожжи, например *Pichia pastoris*, трансформированные плазмидой, кодирующей ИФР-1. Преследуя цель максимизировать выход белка, обеспечивают сверхэкспрессию ИФР-1 в бактериях, что приводит к агрегированию белка в тельцах включения, которые содержат плотно упакованный целевой белок (и небольшое количество других белков) и легко отделяются от клеток. Проблема заключается в том, что белок в составе телец включения не имеет правильной третичной структуры, а сами тельца включения нерастворимы, в связи с чем их необходимо солюбилизовать в условиях, которые приводят к денатурации белка, а затем подвергнуть фолдингу (рефолдингу, укладке), т. е. сворачиванию в правильную третичную структуру.

В отличие от бактерий, дрожжи, как правило, секретируют продуцируемый белок в культуральную среду, что уменьшает проблемы с неправильно свернутым белком. Однако, это более сложный для оптимизации продукт, дающий в среднем меньший выход целевого белка.

Технологии денатурации (солюбилизации) и фолдинга разнятся по общему выходу, по выходу белка требуемой конформации, по возможности масштабировать процесс, по экономичности. Не существует универсального подхода для всех целевых белков; в процессе фолдинга помимо корректного сворачивания может наблюдаться некорректное сворачивание и агрегация белка, а, следовательно, требуется тонкая настройка этого процесса для повышения эффективности и выхода (Eiberle M., Jungbauer A. Technical refolding of proteins: Do we have freedom to operate? Biotechnology Journal, 2010, 5 (6), pp. 547).

Солюбилизация достигается за счет использования, например, хаотропных агентов, например мочевины или солей гуанидина, в высоких концентрациях. Далее следует фолдинг, при котором создают условия, способствующие правильной укладке и образованию дисульфидных связей между целевыми аминокислотными остатками. Для этой цели применяют различные агенты, в том числе мочевины и соли гуанидина (но в более низких концентрациях), циклодекстрины, нитрат этиламмония и т. п. Буфер для фолдинга должен содержать окислительно-восстановительный компонент (редокс-пару) для обеспечения образования дисульфидных связей, например глутатион окисленный-восстановленный, цистеин-цистин и т. п.

Известен способ получения рекомбинантного ИФР-1 в *Escherichia coli*, при котором бактерию трансформируют кодирующей ИФР-1 плазмидой pET15, культивируют бактерию, выделяют тельца включения, солюбилизируют их в буфере с мочевиной в течение 12 ч, и проводят фолдинг с буфером, содержащим редокс-пару глутатион-глутатиондисульфид, затем центрифугируют и очищают с помощью гель-фильтрации (Jafari S. et al., Recombinant production of mecasermin in E. coli expression system. Res Pharm Sci. 2014 Nov-Dec;9(6):453-61). В этом документе не раскрыты детали относительно выхода и активности полученного белка.

В патенте US5650496 раскрыто получение правильно свернутого ИФР-1 в дрожжах *Pichia pastoris* с помощью способа, включающего очистку белка на катионообменной смоле, разворачивание/фолдинг, хроматографию гидрофобных взаимодействий, очистку белка на катионообменной смоле, обращенно-фазовую хроматографию, гель-проницающую хроматографию, диафильтрацию. Предпочтительный состав буфера для разворачивания/фолдинга включает 2 М мочевины, 1,5 мМ хлорида натрия, 15% этано-

ла, 5 мМ бората натрия и 0,2 мМ дитиотрейтола при рН 9,0-9,5. Этот способ является трудоемким и затратным; кроме того, неясна эффективность этого способа при работе с тельцами включения.

Остается потребность в способах очистки рекомбинантного ИФР-1 с более высокой эффективностью, высоким общим выходом белка, высоким выходом правильно уложенного функционального белка, экономичностью и масштабируемостью, универсальностью в отношении сырья. Кроме того, необходим способ, который бы подходил для очистки белка, продуцируемого в бактериальной клетке.

Сущность изобретения

Вышеуказанные проблемы решаются настоящим изобретением, а именно способом очистки белка ИФР-1, включающим:

а) денатурацию белка с помощью солибилизирующего буфера, содержащего 7-8 М мочевины и 2-10 мМ дитиотрейтола, с рН не менее 12,5;

б) фолдинг белка;

с) хроматографическую очистку;

д) смену буферного раствора;

причем стадия фолдинга (б) включает:

б1) смешивание полученной на стадии (а) смеси с фолдирующим буфером в соотношении 1:2-1:3 об.:об., причем фолдирующий буфер содержит воду, стабилизатор, представляющий собой сахар или полиол, и пропанол; и с окислительно-восстановительным компонентом, представляющим собой цистеин и цистамин, который содержится в указанном фолдирующем буфере или добавляется отдельно; и инкубирование полученной смеси в течение не менее 5 суток;

б2) разведение полученной на стадии (б1) смеси ацетатным буфером в соотношении 1:3-1:3,5 об.:об. таким образом, чтобы рН составлял 5,4-5,7;

б3) добавление пероксида водорода к полученной на стадии (б2) смеси в концентрации 0,03-1,96 ммоль/л, инкубирование в течение не менее 30 мин;

б4) центрифугирование полученной смеси и фильтрацию супернатанта, который затем направляют на стадию (с).

Предложенный способ обеспечивает следующие преимущества:

большой выход продукта;

продукт характеризуется меньшим количеством неправильно уложенных форм ИФР-1, т. е. большей долей правильно уложенного ИФР-1;

возможно получение белка в высоких концентрациях;

сниженное содержание примеси продуцента (белков, ДНК и/или ЛПС).

Помимо указанного выше, способ очистки является экономически выгодным, поскольку

позволяет при имеющемся выходе белка тратить меньшее количество реактивов,

использовать менее ценные реагенты (например, избегать использования аргинина),

проводить процесс при комнатной температуре.

В частности, высокий выход достигается за счет снижения потерь, прежде всего

выпадения осадка, на стадиях денатурации, фолдинга и хроматографической очистки, а

высокий выход правильно уложенной формы ИФР-1 достигается за счет указанных выше существенных условий проведения фолдинга.

В предпочтительных воплощениях способ характеризуется одним или несколькими из указанных ниже признаков:

пропанол представляет собой изопропанол;

сахар представляет собой сахарозу;

стадия (с) включает хроматографическую очистку на сульфопропилсефарозе и на бутилсефарозе;

стадию (д) смены буферного раствора выполняют методом ультрафильтрации, сайз-эксклюзионной хроматографии или диализа;

концентрация каждого из цистеина и цистамин в образуемой на стадии (б1) смеси составляет 1-4 мМ;

рН на стадии (б1) составляет 10,5.

Изобретение также относится к продукту ИФР-1, который получен способом по изобретению и представляет собой, без ограничения, фармацевтическую, ветеринарную и/или косметическую субстанцию или лабораторный реагент; и к применению указанного продукта по медицинскому, ветеринарному, и/или косметическому назначению, или для научных исследований.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения продукта ИФР-1, включающему продуцирование ИФР-1 в клетке-продуценте, например в бактериальной, дрожжевой, растительной или животной клетке, и очистке с помощью охарактеризованного выше способа очистки. Предпочтительной клеткой-продуцентом является бактериальная клетка, наиболее предпочтительно *Escherichia coli*.

Перечень графических материалов

Фиг. 1: Диаграмма, показывающая выход белка (вертикальная ось, г) в зависимости от времени фолдинга (горизонтальная ось, сутки) для способа по изобретению в сравнении со способом, в котором

не используют пару цистеин-цистамин, и способом, в котором не используют перекись водорода. Исходная масса белка, подававшаяся на очистку, составляла 10 г.

Фиг. 2: Хроматограмма ВЭЖХ для продукта, полученного способом по изобретению (по горизонтальной оси - время удержания, мин; по вертикальной - миллиоптические единицы).

Фиг. 3: Хроматограмма ВЭЖХ для продукта, полученного сравнительным способом (по горизонтальной оси - время удержания, мин; по вертикальной - миллиоптические единицы).

Фиг. 4: Исследование активности белка, очищенного способом по изобретению. А и Б: эксперимент с конверсией резазурина в резофурин, Б - визуально, А - оценка с помощью флуориметра (вертикальная ось - ОЕ, оптические единицы); В - оценка ускорения клеточного роста (порядок образцов на Фиг. 4А-4В одинаковый).

Подробное описание изобретения

Синтез ИФР-1.

Для осуществления изобретения подходит неочищенный ИФР-1, полученный любым способом. Как правило, ИФР-1 получают в экспрессионных системах, например в бактериях (*Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis* и т. д.), дрожжах (*Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* и т. д.), клетках животных (СНО (клетки яичника китайского хомячка) и т. д.) и даже растений (растение *Nicotiana tabacum*, суспензия каллуса риса *Oryza sativa* и т. д.). Экспрессионные системы различаются по выходу белка, его активности (определяемой, прежде всего правильностью третичной структуры), трудоемкости процесса. Способ очистки, предложенный в заявке, принципиально подходит для очистки ИФР-1, полученного в любой из экспрессионных систем, поскольку проводится эффективный фолдинг с получением правильной третичной структуры вне зависимости от исходного состояния экспрессированного белка.

Различные способы получения ИФР-1 раскрыты, без ограничения, в US5324639, US5650496, RU2372941, RU2711111. Дополнительные средства и методы получения рекомбинантных белков известны специалисту в данной области, например, из Sambrook J. & Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); и Coligan et al., *Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons, Inc. (2003).

Способом по изобретению можно очищать различные варианты ИФР-1, обладающие биологической активностью ИФР-1 и, следовательно, пригодные для применения в медицине, ветеринарии, косметике и в научных исследованиях. Предпочтительно, ИФР-1 представляет собой человеческий ИФР-1 (hIGF-1), имеющий 70 аминокислотных остатков (7,6 кДа), также известный как мекасермин (Increlex): GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGIGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLLEY CAPLK-PAKSA (DB01277; также известны варианты мекасермина с I в положении 4 или с Y в положении 43 относительно указанной последовательности, которые могут применяться для очистки). Может быть использован, например, вариант из 71 аминокислотных остатков с добавленной первой аминокислотой M (GenBank: CAA01954.1), или des(1-3)IGF-1, представляющий собой укороченный вариант (67 аминокислотных остатков), в котором отсутствуют первые три аминокислоты (GPE). В неограничивающих воплощениях может быть использован ИФР-1 с селеноцистеином в положениях 4, 29, 41, 43, как известно из WO2018204764; или с аланином, глицином или серином в одном или нескольких положениях 3, 4, 5, 10, 14, 17, 23, 24, 25, 43, 49 или 63 и любой аминокислотой в положении 7, как известно из WO2000040612; или с метионином в положении 43 и, необязательно, с добавленной первой аминокислотой M, как известно из RU2711111; с изолейцином в положении 4 и любые иные варианты, которые можно применять в качестве биологически активного ИФР-1.

При решении о том, какой организм использовать для производства ИФР-1, склоняются, как правило, к бактерии, в частности *Escherichia coli*, поскольку простота работы с ней, а также высокий выход белка, по-видимому, перевешивают остальные недостатки, такие как необходимость избавляться от бактериальных токсинов и отсутствие правильной третичной структуры экспрессируемого в бактерии белка. Именно в *Escherichia coli* получают мекасермин.

Как отмечалось ранее, сверхэкспрессия в бактериях приводит к накоплению белка в тельцах включения, которые можно достаточно просто выделить путем лизиса клеток, центрифугирования и отмывки, как известно специалистам (Palmer I, Wingfield PT. *Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci*. 2004 Nov; Chapter 6:6.3.1-6.3.18). Лизис можно осуществить, например, ультразвуком, давлением, ферментативно, химически и другими способами, а также их комбинациями. Предпочтительно использовать ультразвуковой гомогенизатор или гомогенизатор высокого давления, еще более предпочтительно в комбинации с химическим или ферментативным лизисом. Лизирующий буфер может содержать, например, бензамидина гидрохлорид, ДТТ, Трис и ЭДТА; в состав буфера необязательно могут быть включены один или несколько ингибиторов протеаз.

После лизиса и центрифугирования осадок промывают растворами детергентов и хаотропов в низкой концентрации (мочевина или гидрохлорид гуанидина) с дальнейшим центрифугированием и получением осадка, содержащего тельца включения, который далее можно подавать в способ очистки по изо-

бретению.

В случае, когда неочищенный препарат ИФР-1 представляет собой раствор, например культуральную среду в случае секреторной экспрессии, предварительно проводят концентрирование белка, например осаждением, в частности добавлением сульфата аммония, или любыми другими известными специалистами методами. Осадок может быть отмыт известными способами перед подачей в способ очистки по изобретению. Наиболее предпочтительно для реализации изобретения в качестве исходного препарата ИФР-1, подлежащего очистке, использовать тельца включения. При дальнейшем изложении тельца включения упоминаются только для удобства изложения, при этом подразумевается, что их можно заменить на другой препарат ИФР-1. Солюбилизацию проводят, добавляя "солюбилизирующий буфер", представляющий собой концентрированный раствор мочевины (7-9 М, предпочтительно не менее 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 М и/или не более 8,9, 8,8, 8,7, 8,6, 8,5, 8,4, 8,3, 8,2, 8,1 М, предпочтительно 7-8 М, наиболее предпочтительно приблизительно 8 М) в буфере с рН не менее 12,5 (в разных воплощениях может составлять примерно 12,6, 12,7, 12,8, 12,9, 13 или выше), а также ДТТ (дитиотреитол) в эффективном количестве, предпочтительно 2-10 мМ. В частности нижняя граница диапазона содержания ДТТ может составлять не менее 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 или 6 мМ; верхняя граница - не более 9,9, 9,8, 9,7, 9,6, 9,5, 9,4, 9,3, 9,2, 9,1, 9, 8,9, 8,8, 8,7, 8,6, 8,5, 8,4, 8,3, 8,2, 8,1, 8, 7,9, 7,8, 7,7, 7,6, 7,5, 7,4, 7,3, 7,2, 7,1, 7, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1 или 5. В предпочтительном воплощении содержание ДТТ в буфере составляет 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мМ. ДТТ может быть добавлен в солюбилизирующий буфер до того, как подлежащий очистке препарат ИФР-1 будет смешан с этим буфером; в альтернативном воплощении сначала смешивают указанный препарат с буфером, содержащим мочевины, а затем после тщательного ресуспендирования добавляют ДТТ. Основу буфера может составлять водный раствор Трис HCl или иное известное специалистам для таких целей вещество. рН буфера регулируют до указанного выше значения с помощью подходящей щелочи, например гидроксида натрия или калия, не ограничиваясь указанным.

Соотношение белкового препарата и солюбилизирующего буфера принципиально не ограничено и выбирается таким, чтобы достичь эффективной солюбилизации, например не менее 10,15,20, 25, 30, 35,40 мл на 1 г препарата.

Смесь препарата ИФР-1 с солюбилизирующим буфером инкубируют при перемешивании не менее получаса, например не менее 45 мин, 1, 1,5, 2, 2,5 или 3 ч. Цель данной стадии ("стадия денатурации) состоит в как можно более полном растворении препарата белка с разрушением его пространственного строения.

На следующей стадии (стадия фолдинга) смешивают полученный на предыдущей стадии раствор с фолдирующим буфером в соотношении 1:2-1:3 (по объему). Фолдирующий буфер содержит воду, стабилизатор, представляющий собой сахар или полиол, и пропанол.

Сахар может быть выбран из моносахаридов или дисахаридов, например сахарозы, трегалозы, галактозы, лактозы, глюкозы, или их смесей. Полиол может представлять собой диол, триол, тетраол, пентаол, гексаол или их смеси; в неограничивающих воплощениях полиол выбран из, например, глицерина, пропиленгликоля, бутандиола эритрита, пентаэритрита, ксилита, сорбита, маннита, рибита или их смесей. Предпочтительно, стабилизатор выбран из глицерина, сахарозы, глюкозы, трегалозы или их смеси, наиболее предпочтительно представляет собой сахарозу. Стабилизатор используется в эффективном количестве, известном специалисту (Butler SL, Falke JJ. Effects of protein stabilizing agents on thermal backbone motions: a disulfide trapping study. *Biochemistry*. 1996 Aug 20; 35(33): 10595-600). Количество стабилизатора в фолдирующем буфере предпочтительно составляет от 1 мМ до 5 М, например не менее 2, 3,4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30,40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300,400, 500, 600, 700, 800 или 900 мМ, 1,2 или 3 М; например не более 4, 3, 2 или 1 М; и наиболее предпочтительно составляет 1 М. Пропанол может представлять собой изопропанол, н-пропанол или их смесь. Количество пропанола может составлять 30-50% (об./об.), например не менее 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50%; например не более 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31%.

Окислительно-восстановительный (редокс) компонент выбран из пары цистеин-цистамина. Концентрация каждого вещества в смеси фолдирующего буфера с раствором, полученным на стадии солюбилизации, составляет обычно 0,1-10 мМ, например от 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2 мМ или выше; например 9,5, 9, 8,5, 8, 7,5, 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1 или 1 мМ или ниже.

Предпочтительно, используется по 1-4 мМ каждого, наиболее предпочтительно - по 1 мМ каждого. Соотношение между цистеином и цистамином не является принципиальным и может составлять от 1:4 до 4:1, например 1:4,1:3, 1:2,1:1,2:1,3:1 или 4:1. Пара цистеин-цистамина может быть заранее добавлена в фолдирующий буфер, который затем смешивают с раствором, полученным на стадии солюбилизации. Как правило, в таком варианте осуществления буфер используют сразу после изготовления. В альтернативном воплощении пару цистеин-цистамина добавляют во время или после смешивания раствора, полученного на стадии солюбилизации, с фолдирующим буфером. рН фолдирующего буфера регулируют так, чтобы он находился в щелочном диапазоне, предпочтительно более 10, например 10-11, в частности,

10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8 или 10,9. Если цистеин-цистамин добавляют в фолдирующий буфер отдельно, в одном воплощении рН подводят, при необходимости, перед добавлением цистеина-цистамина.

Полученную на стадии фолдинга смесь инкубируют в течение не менее 5 суток. В частности, продолжительность инкубирования может составлять 5, 6, 7, 8, 9 или 10 суток. Инкубирование предпочтительно проводят при комнатной температуре и постоянном перемешивании.

После инкубирования полученную смесь разводят ацетатным буфером в соотношении смесь:буфер, составляющем 1:3-1:3,5 (по объему). При этом контролируют рН таким образом, чтобы он составлял не более 5,7, предпочтительно в диапазоне 5,4-5,7, например 5,4, 5,5, 5,6 или 5,7, регулируя его добавлением, например, уксусной кислоты после смешивания смеси и буфера. Ацетатный буфер может быть изготовлен, например, на основе водного раствора ацетата натрия. Предпочтительно в буфер дополнительно добавляют поверхностно-активное вещество (ПАВ), предпочтительно неионное ПАВ, в частности этоксилаты жирных спиртов, этоксилаты жирных кислот, алкилфенолэтоксилаты, этоксилированные амины или амиды жирных кислот, эфиры жирных кислот и сорбита, эфиры жирных кислот и глицерина, эфиры жирных кислот и полигидроксисоединений, полоксамеры и т. п. ПАВ. Неограничивающие примеры ПАВ включают семейство Tween (твин, Polysorbate, полисорбат), например полисорбат-20 (твин-20), или Triton X, например Triton X-100. Наиболее предпочтителен полисорбат-20. Количество ПАВ в ацетатном буфере может составлять, не ограничиваясь указанным, 0,05-5%, например 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2,0% или в пределах любого поддиапазона, образуемого любыми из указанных значений.

После стадии разведения к смеси добавляют пероксид водорода в количестве, при котором в смеси обеспечивается концентрация пероксида водорода 0,03-1,96 ммоль/л. В частности, эта концентрация может составлять от 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 1, 1,05, 1,1, 1,15, 1,2, 1,25, 1,3, 1,35, 1,4, 1,45, 1,5, 1,55, 1,6, 1,65, 1,7, 1,75, 1,8, 1,85 или 1,9; и/или до 1,9, 1,85, 1,8, 1,75, 1,7, 1,65, 1,6, 1,55, 1,5, 1,45, 1,4, 1,35, 1,3, 1,25, 1,2, 1,15, 1,1, 1,05, 1, 0,95, 0,9, 0,85, 0,8, 0,75, 0,7, 0,65, 0,6, 0,55, 0,5, 0,45, 0,4, 0,35, 0,3, 0,25, 0,2, 0,15 или 0,1. При использовании 30%-го водного раствора пероксида водорода можно руководствоваться соотношением раствор перекиси водорода:смесь, составляющим от 1:250000 до 1:5000 (об./об.), например 1:250000, 1:240000, 1:230000, 1:220000, 1:210000, 1:200000, 1:190000, 1:180000, 1:170000, 1:160000, 1:150000, 1:140000, 1:130000, 1:120000, 1:110000, 1:100000, 1:90000, 1:80000, 1:70000, 1:60000, 1:50000, 1:40000, 1:30000, 1:20000, 1:10000 или 1:5000 или находящимся в любом поддиапазоне, образованном любыми из указанных значений. Использование раствора другой концентрации пероксида водорода входит в объем настоящего изобретения, и вышеуказанное соотношение будет пропорционально изменено, как известно специалистам в данной области. После добавления пероксида водорода инкубируют полученную смесь в течение не менее 30 мин; в некоторых воплощениях продолжительность может составлять не менее 45 мин, 1, 1,5, 2, 2,5 или 3 ч. Представляется, что добавление пероксида водорода позволяет избежать "залипания белка на колонке, что позволяет дополнительно увеличить выход.

После инкубирования полученную смесь центрифугируют, а супернатант отделяют и фильтруют.

Полученный раствор направляют на стадию хроматографической очистки (ВЭЖХ). Выбор методов хроматографической очистки не принципиален для осуществления способа по изобретению и остается на усмотрение специалиста. Виды хроматографических методов очистки рекомбинантных белков, используемые реагенты и оборудование хорошо известны специалистам в данной области; практические аспекты этих методов раскрыты, например, в Protein Purification Handbook. GE Healthcare Bio-Sciences AB 18-1132-29 AD 02/2007. Общий подход в очистке белка заключается в минимизации количества стадий (поскольку на каждой стадии неизбежны потери целевого белка) и использовании различных методик, если используется более одной стадии. Следует учесть, что подбор методов очистки может зависеть от: (а) природы примесей, что в свою очередь зависит от исходного препарата белка, подаваемого на очистку в способ; и (б) области применения очищенного белка. Так, например, при продуцировании белка в бактериальных системах получаемый препарат может содержать пирогены - бактериальные экзо- и эндотоксины, содержание которых необходимо контролировать, если белок будет использоваться в медицине или ветеринарии, особенно в виде форм для парентерального введения. Как правило, контролируют уровень липополисахаридов (ЛПС) с помощью, например, LAL-теста (ОФС. 1.2.4.0006.15 "Бактериальные эндотоксины").

В различных воплощениях способа по изобретению могут быть использованы следующие хроматографические методики: ионообменная (ИОХ, ИЕХ), гель-фильтрационная (или (сайз-)эксклюзионная; GF или SEC), гидрофобного взаимодействия (ГХ, НИС), обращенно-фазовая (ОФХ, RPC), аффинная (АС, АХ) и другие типы. В объем изобретения входят 1 или более одного (2, 3 или 4) этапов хроматографической очистки, и/или 1 или более одного (2, 3 или 4) типов хроматографической очистки. Предпочтительно, количество этапов и/или типов хроматографической очистки минимизировано, например 1 или 2 этапа/типа. Наиболее предпочтительно, используется 2 этапа очистки, представляющие собой 2 типа хроматографической очистки, например ионообменную хроматографию и хроматографию гидрофобного взаимодействия или любую комбинацию из любых двух вышеуказанных методик. Еще более предпочтитель-

но, сначала проводят ИОХ, затем ГХ. Под указанным выше одним типом хроматографической очистки понимается также использование различных видов подвижной и/или неподвижной фаз, например, в случае ИОХ, - использование разных ионообменников (например, сильный/слабый).

В случае ИОХ, неподвижная фаза может быть выбрана, без ограничения, из диэтиламиноэтилцеллюлозы (DEAE целлюлоза), сефадекса с группами четвертичного аминоэтила (QAE сефадекс), сефарозы с группами четвертичного аммония (Q сефароза), карбоксиметилцеллюлозы (CM целлюлоза), сульфопропилсефарозы (SP сефароза), полимера полистирола/дивинилбензола с метилсульфатными группами (SOURCE C) и т. п. Предпочтительно, используется SP сефароза.

В случае ГХ, неподвижная фаза имеет, без ограничения, группы фенил, октил, бутил и т. п., предпочтительная неподвижная фаза - бутилсефароза.

Различные примеры хроматографической очистки ИФР-1 известны специалистам в данной области (см., например, Ищук С. А. с соавт. Получение рекомбинантного инсулиноподобного фактора роста-1 и его действие на клетки нейробластомы *in vitro*. Медицинский академический журнал. 2018. Том 18. № 4).

После стадии хроматографической очистки проводят смену буферного раствора, в котором находится ИФР-1, любым известным специалистам способом с получением раствора ИФР-1, пригодного для использования в любых целях. В неограничивающих воплощениях может применяться любой из указанных методов: ультрафильтрация, диализ, эксклюзионная хроматография или иной метод и их комбинации (Flickinger, M.C., Reis, R.V. and Zydney, A.L. (2010). Protein Ultrafiltration. In Encyclopedia of Industrial Biotechnology, M.C. Flickinger (Ed.); Size Exclusion Chromatography. Principles and methods. Cytiva. CY12707-03Dec20-NB; Andrew, S.M., Titus, J.A. and Zumstein, L. (2001), Dialysis and Concentration of Protein Solutions. Current Protocols in Toxicology, 10: A.3H.1-A.3H.5). Конечный состав раствора ИФР-1 зависит от назначения получаемого белка, и может состоять из (помимо белка) воды или подходящего буфера (фосфатный, ацетатный и т. д.). В различных воплощениях, раствор ИФР-1 может также необязательно содержать ПАВ (например, твин-20) и/или консервант (например, бензиловый спирт). ИФР-1 (т.е. препарат, раствор, продукт, композиция ИФР-1), полученный способом очистки по изобретению пригоден для любых целей, например хранения, переработки, изготовления фармацевтических, ветеринарных, косметических, лабораторных и прочих препаратов, в том числе путем лиофилизации; или непосредственного использования в качестве биологически активного вещества. Настоящее изобретение также относится к препарату ИФР-1, полученному способом очистки по изобретению, и к применению этого препарата в медицине, спортивной индустрии, ветеринарии, косметике, лабораторных исследованиях.

Если в данной заявке не определено иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, имеют обычные для данной области техники значения, которые понятны специалистам. В общем, используемые номенклатура и методы клеточной и тканевой культуры, молекулярной биологии, микробиологии и химии белков и нуклеиновых кислот, гибридизации, аналитической химии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, описанные в данной заявке, представляют собой номенклатуру и методы, хорошо известные и обычно использующиеся в данной области.

Используемая здесь терминология предназначена для целей описания конкретных вариантов воплощения изобретения и не является ограничивающей. Когда в настоящем описании и формуле изобретения встречаются формы единственного числа, они также должны пониматься как альтернативно подразумевающие множественное число, если контекст явным образом не указывает на иное.

Любые раскрытые здесь числовые значения предусматривают варьирование в пределах погрешности измерений, обусловленной обычно применяемыми методами и оборудованием для каждого конкретного параметра. Таким образом, числовые значения также могут рассматриваться как характеризующие термином "приблизительно", "около" или "примерно".

Термины "включающий", "содержащий", "имеющий" и т. п. означают, что помимо указанных элементов (например, ингредиентов) могут содержаться иные неоговоренные (несущественные) элементы. В каждом случае данные термины также охватывают значение "состоящий из", т. е. в одном из воплощений подразумевают, что описываемый объект характеризуется наличием только указанных элементов.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

Представленные далее примеры не ограничивают объем притязаний, который определяется формулой изобретения. Специалист будет понимать, что с учетом ограничений, накладываемых формулой, изобретение предполагает различные варианты воплощений, все из которых включены в объем защиты, обеспечиваемой патентом.

Пример 1. Получение и очистка рекомбинантного ИФР-1.

Получение биомассы, содержащей ИФР-1.

Получали ИФР-1 (GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGMVDE CCFRSC DLRRLEMYCAPLKPAKSA) способом, описанным в RU2711111: трансформировали клетки *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen, USA) вектором на основе плазмиды pET28a(+), содержащей вставку, кодирующую ИФР-1; биомассу культивировали в биореакторах объемом 40 и 300 л. В ходе культивирования отслеживали показатели оптической плотности, pH, pO₂. Клетки осаждают проточным центрифугированием. Проверяли количество целевого белка в биомассе методом электрофореза и в работу допускали только

биомассу, имеющую удовлетворительные результаты анализа.

Выделение и отмывка телец включения.

Для всех работ использовали высокоочищенную воду с кондуктивностью менее 0Д мкСм/см. Все процедуры взвешивания производили с помощью лабораторных весов с точностью измерения 0,01 г. При приготовлении растворов объемы добавляемых реактивов измеряли с помощью мерных цилиндров.

Помещали навеску биомассы в емкость, содержащую первый отмывочный буфер (в соотношении биомасса:буфер, составляющем 1:10 (г:мл)), и ресуспендировали до однородного состояния с помощью миксера погружного типа, избегая вспенивания. Проводили дезинтеграцию клеток при помощи соникатора. Суспензию центрифугировали при 12000 об/мин, и по окончании центрифугирования осадок телец поместили в емкость, содержащую второй отмывочный буфер (в соотношении тельца:буфер, составляющем 1:10 (г:мл)), и гомогенизировали с помощью погружного миксера до однородности.

Отмывочные буферы содержат 2 М мочевины, 100 мМ ТрисНСl, рН 7,0, 5 мМ ЭДТА, 5 мМ ДТТ, 2% Triton X-100.

Солюбилизация и фолдинг.

Взвешивали отмывые тельца и затем тщательно ресуспендировали в солюбилизирующем растворе, содержащем 8 М мочевины и 25 мМ ТрисНСl при рН 12,5, в соотношении тельца:буфер, составляющем 1:20 (г:мл). Затем к смеси добавляли 5 мМ ДТТ и инкубировали при перемешивании не менее получаса до полного растворения. К полученной смеси добавляли фолдирующий буфер, содержащий 1 М сахаразы, 40% изопропанола в соотношении 1:3 (мл:мл), подводили рН до 10,5 гидроксидом натрия, затем добавляли 1 мМ цистеина и 1 мМ цистамина в порошке (концентрация относительно конечного объема смеси). Полученную фолдирующую смесь инкубировали при комнатной температуре и постоянном перемешивании в течение не менее 5 суток (общая продолжительность эксперимента - 8 суток), при этом отбирали пробу для ВЭЖХ раз в сутки для контроля процесса фолдирования.

По окончании фолдирования смесь при перемешивании разводили буфером для разведения, содержащим 15 мМ ацетата натрия, 1% полисорбата-20, в соотношении смесь:буфер, составляющем 1:3 (мл:мл). рН полученной смеси доводили до значения в диапазоне 5,4-5,7 с помощью уксусной кислоты. Затем добавили 30%-й пероксид водорода в соотношении 1:5000 (мл:мл) и инкубировали при комнатной температуре и перемешивании 30 мин.

Параллельно проводили контрольные эксперименты: в одном из них фолдинг проводили без использования редокс-пары, а в другом осуществляли способ согласно изобретению, но без добавления пероксида водорода. Выход в каждом случае посуточно показан на Фиг. 1. Как видно, добавление пероксида водорода существенным образом влияет на выход белка, по-видимому, обеспечивая обратимость связывания белка с неподвижной фазой колонки и его более эффективное элюирование. Время фолдинга (более 5 сут) существенно уменьшает потери белка на последующих стадиях, обеспечивая высокий выход. Использование цистеина-цистина позволяет повысить выход белка в большей степени.

Полученную суспензию центрифугировали при 3700 об/мин, супернатант отделяли и фильтровали через тканевый и капсульный фильтры.

Хроматография.

Очищали ИФР-1 на хроматографической колонке, содержащей SP Sepharose Fast Flow следующим образом. Колонку (объем сорбента SP Sepharose Fast Flow составляет 270 мл, 1 мл сорбента связывает 50 мг белка) при скорости потока 40 мл/мин промывали 300 мл очищенной воды для удаления раствора этанола, затем 1 М NaOH, затем опять водой. Промывали колонку 200 мл элюирующего буфера (буфер В (15 мМ ацетат натрия, 1% Твин-20, 1 М NaCl, рН 5,4) при скорости потока 40 мл/мин. Уравновешивали колонку 300 мл стартового буфера (буфер А (15 мМ ацетат натрия, 1% Твин-20, рН 5,4), при скорости потока 40 мл/мин. Наносили раствор белка (фильтрованный супернатант с предыдущей стадии) на колонку при скорости потока 40 мл/мин с помощью пробоотборного насоса. Промывали колонку 300 мл стартового буфера при скорости потока 40 мл/мин. Затем проводили элюирование в градиенте от 0 до 50% элюирующего буфера В за 35 минут при скорости потока 40 мл/мин. Собирали пик, соответствующий целевому белку, в емкость объемом 500 мл и измеряли полученный объем. Отбирали образец на анализ методом спектрофотометрии и оценивали количество полученного белка. Колонку регенерировали по программе СІР для SP Sepharose (2 М NaCl, 1 М NaOH) и консервировали. Измерение оптической плотности проводилось при длине волны 280 нм.

Далее проводили депирогенизацию белка на хроматографической колонке, содержащей бутилсефарозу, следующим образом. Колонку (объем сорбента составляет 314 мл) промывали при скорости потока 20 мл/мин 400 мл очищенной воды, затем 30%-м изопропанолом и водой, затем 1 М NaOH, потом опять водой и уравновешивали колонку 500 мл буфера А (1 М сульфата аммония, 50 мМ ТрисНСl, рН 8) при скорости потока 20 мл/мин. Перед нанесением на колонку разводили раствор белка, полученный на предыдущем этапе, до концентрации 5 мг/мл 3 М сульфатом аммония и 1 М ТрисНСl (рН 8) так, чтобы в конечном растворе было 1 М сульфата аммония и 50 мМ ТрисНСl. Наносили полученный раствор белка на колонку при скорости потока 20 мл/мин с помощью пробоотборного насоса. Промывали колонку 400 мл стартового буфера (А) при скорости потока 20 мл/мин. Смывали белок 100% элюирующим буфером В (15 мМ ацетат натрия, 1% Твин-20, рН 5,4) за 35 минут при скорости потока 20 мл/мин. Собирали пик,

соответствующий целевому белку, в емкость объемом 500 мл и измеряли объем полученного белка. Отбирали образец на анализ методом спектрофотометрии и оценивали количество полученного белка. Колонку регенерировали по программе SIP для бутилсефарозы (1M NaOH) и консервировали. Измерение оптической плотности проводилось при длине волны 280 нм.

Смена буфера.

Помещали раствор белка, полученный на предыдущем этапе, в диализный мешок с диаметром пор не менее чем в 2 раза меньше размера белка. Мешок с белком помещали в крупную ёмкость с буфером, содержащим 15 мМ ацетата натрия, 1% твина. Оставляли на 6 ч (из них 3 ч при перемешивании). Повторяли указанные манипуляции 3-4 раза и получали белковый раствор, по существу не содержащий сульфат аммония. Образцы разводили в буфере, содержащем 15 мМ ацетате натрия, 1% твин, 0,5% бензилового спирта, до концентрации 5 мг/мл, затем фильтровали через антибактериальный фильтр в чистые банки тёмного цвета. Полученный препарат хранили при +4°C. Отбирали образец для проведения контроля качества согласно ФСП, включающего в себя определение концентрации белка методом ВЭЖХ, определение количества белков штамма продуцента, определение количества ДНК штамма продуцента, определение остаточного количества ЛПС LAL-тестом. Продукт, полученный способом по изобретению, соответствует следующим показателям:

содержание ДНК штамма продуцента не более 3 нг/мл,
содержание белков штамма продуцента не более 8 нг/мл,
уровень ЛПС не более 12,5 ЕЭ/мл;

и, следовательно, пригоден для использования по назначению.

Хроматограммы ВЭЖХ для продукта, полученного по изобретению, и продукта, полученного традиционным способом, показаны на Фиг. 2 и 3, соответственно. На Фиг. 3 можно видеть множество изоформ белка, представленных в приблизительно равных соотношениях, что говорит о неоптимальности фолдирования; напротив, на Фиг. 2, соответствующей продукту по изобретению, можно видеть преобладание одного пика нативной формы белка, для подтверждения чего далее проверяли его активность.

Пример 2. Исследование активности очищенного белка.

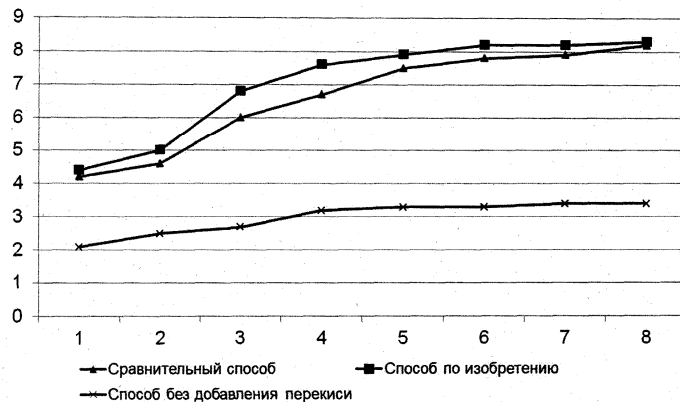
В первую очередь проводили оценку ускорения клеточного роста. Оценивали влияние описанных в литературе низких концентраций гормона (разводили образцы до 4 нг/мл) на рост и дифференцировку клеток линии нейробластомы мышцы Neuro2a. Как видно на микрофотографиях (Фиг. 4В) низкая концентрация гормона влияет на рост клеток: видно увеличение объема клеток, изменение строения (появляются характерные для нейронов отростки), но добавление 10% фетальной сыворотки, содержащей все необходимые для роста и дифференцировки гормоны и вещества, усиливает эффект. Поэтому в дальнейших экспериментах увеличивали концентрации гормона до 100 нг/мл. Далее проводили эксперимент с конверсией резазурина в резоруфин. Резазурин представляет собой феноксазиновый окислительно-восстановительный индикатор. Имея синий или фиолетовый цвет, при восстановлении становится розовым флуоресцирующим резоруфином. Клетки, в том числе линии Neuro2a, во время метаболизма восстанавливают резазурин, а активность метаболизма пропорциональна уровню восстановления резазурина в флуоресцирующий резоруфин. Таким образом, по интенсивности свечения клеток в ультрафиолете можно определить активность добавленного гормона. В планшет с клетками в среде без сыворотки вносили одинаковое количество образца гормона, разведенного в 10000 раз. После инкубации клеток добавляли резазурин и инкубировали 4 ч для конверсии. Оценивали свечение визуально.

Как видно из фотографии (Фиг. 4Б), образец гормона активировал метаболизм клеток по отношению к образцу без добавления сыворотки, что видно даже невооруженным взглядом.

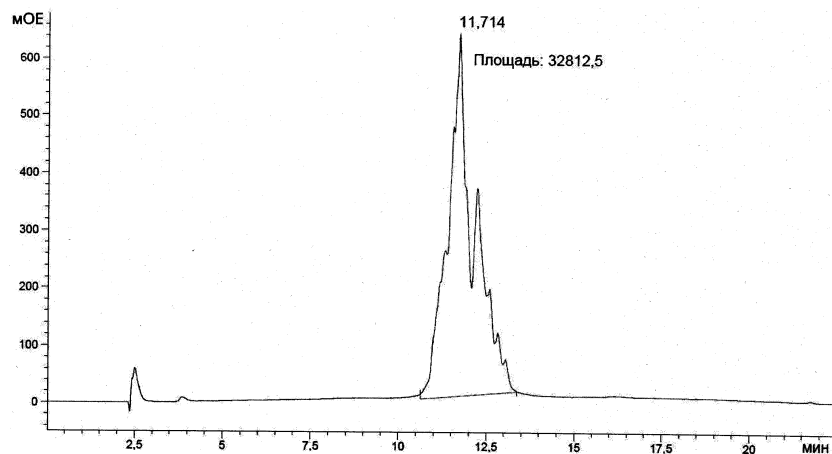
Для более точной оценки влияния продукта на клетки переносили культуральную среду без клеток в другой планшет и измеряли светимость на флуориметре BMG Clariostar по стандартному протоколу "Resazufin". Как видно из полученных данных (Фиг. 4А), продукт имеет высокую активность (выше, чем в образце с добавлением сыворотки), и имеет активность, сравнимую со стандартом от Sigma.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

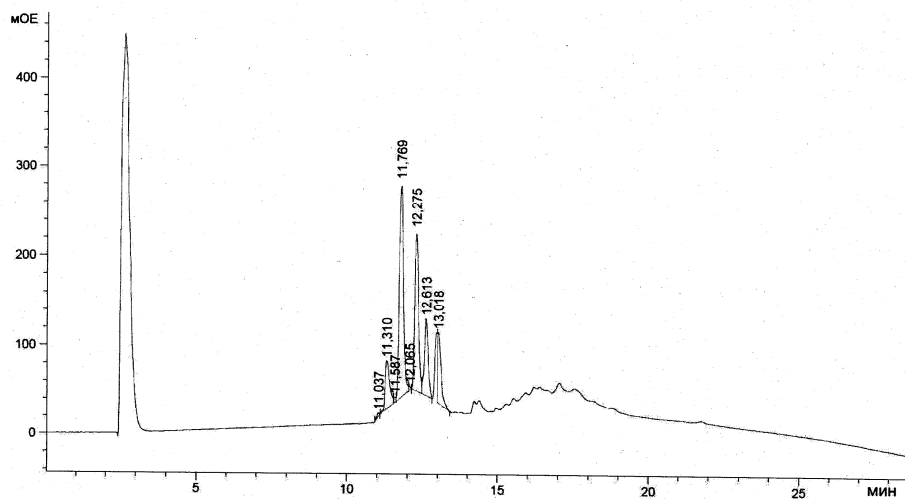
1. Способ очистки белка ИФР-1, включающий:
 - а) денатурацию белка с помощью солюбилизирующего буфера, содержащего 7-8 М мочевины и 2-10 мМ дитиотреитола, с рН не менее 12,5;
 - б) фолдинг белка;
 - в) хроматографическую очистку;
 - г) смену буферного раствора;
 причем стадия фолдинга (б) включает:
 - б1) смешивание полученной на стадии (а) смеси с фолдирующим буфером в соотношении 1:2-1:3 об.:об., причем фолдирующий буфер содержит воду, стабилизатор, представляющий собой сахар или полиол, и пропанол; и с окислительно-восстановительным компонентом, представляющим собой цистеин и пистамин, который содержится в указанном фолдирующем буфере или добавляется отдельно; и инкубирование полученной смеси в течение не менее 5 суток;
 - б2) разведение полученной на стадии (б1) смеси ацетатным буфером в соотношении 1:3-1:3,5 об.:об. таким образом, чтобы рН составлял 5,4-5,7;
 - б3) добавление пероксида водорода к полученной на стадии (б2) смеси в концентрации 0,03-1,96 ммоль/л, инкубирование в течение не менее 30 мин;
 - б4) центрифугирование полученной смеси и фильтрацию супернатанта, который затем направляют на стадию (в).
2. Способ по п.1, где пропанол представляет собой изопропанол, а сахар представляет собой сахарозу.
3. Способ по п.1 или 2, где стадия (в) включает хроматографическую очистку на сульфопропилсфарозе и на бутилсефарозе.
4. Способ по любому из пп.1-3, где стадию (г) смены буферного раствора выполняют методом ультрафильтрации, сайз-экслюзионной хроматографии или диализа.
5. Способ по любому из пп.1-4, где концентрация каждого из цистеина и цистамин в образуемой на стадии (б1) смеси составляет 1-4 мМ.
6. Способ по любому из пп.1-5, где рН на стадии (б1) составляет 10,5.



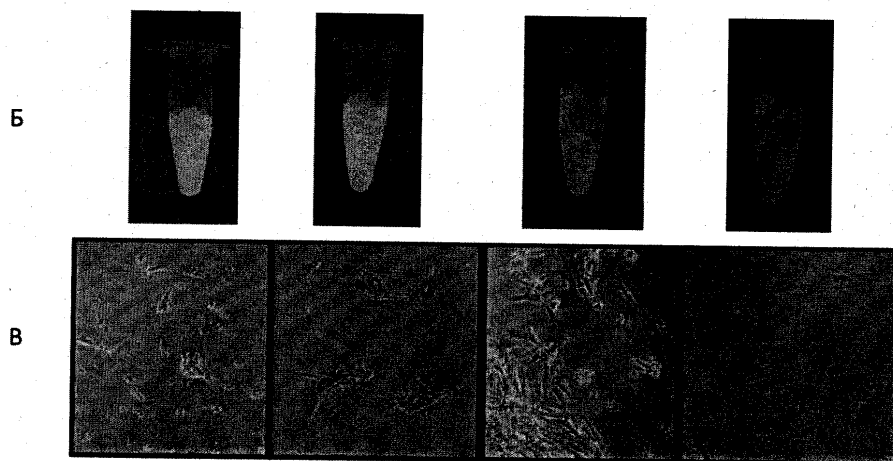
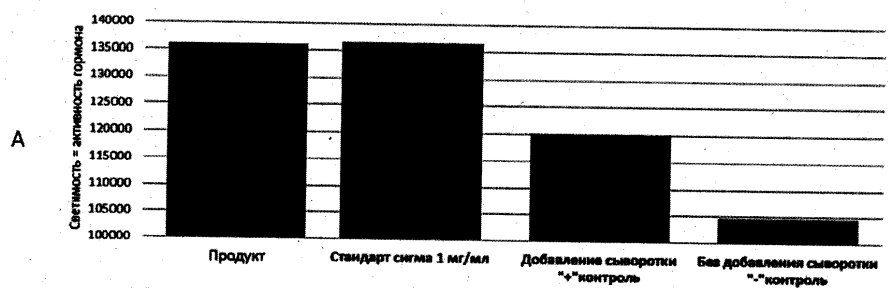
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

